

令和元年5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18778

研究課題名(和文) ザンビアにおける潜在的病原ウイルスに関する調査研究

研究課題名(英文) Research for pathogenic and potentially pathogenic viruses in Zambia

研究代表者

梶原 将大 (Kajihara, Masahiro)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教

研究者番号：70711894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はザンビアにおける疫学調査により既知・未知のウイルスを探索し、その生態を理解すると共に、公衆衛生的なリスク評価を目的に実施した。研究期間にザンビアにおいてマダニ2,327匹およびコウモリ919頭を捕獲し解析に供した。ヒトに対する病原性を有するウイルスとして、イボマダニからはクリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)が、エジプトルーセットオコウモリからはマールブルグウイルスの遺伝子が検出された。また、マダニからは遺伝的に異なる8つのダニ媒介性フレボウイルスが検出され、一部のウイルスは新規ウイルスであると思われる。また、ケンショウコウモリからはコウモリムンプスウイルスが分離された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で検出されたCCHFVおよびマールブルグウイルスは共にヒトに対して致死的な出血熱を引き起こすことで知られている。過去、ザンビアにおいてこれらのウイルスによる感染症が発生したことはなく、その存在を示す研究データも存在しなかった。本研究を通して、ザンビアにもこれらの出血熱ウイルスが存在することが初めて示唆された。本研究の成果は同国のみならず、南部アフリカ地域における公衆衛生において非常に重要な知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, epidemiological and ecological survey for known and unknown viruses was carried out in Zambia to understand ecology of these viruses and evaluate their risk for public health in the southern African region. During the research period, 2,327 ticks and 919 bats were sampled in Zambia. By genetic screening using RT-PCR, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus was detected in Hyalomma ticks. Marburgvirus genome was also detected in cave-dwelling Egyptian fruit bats captured in September 2018. These viruses are known to cause viral hemorrhagic fevers in humans. In addition, tick-borne phleboviruses were also detected. Phylogenetic analysis revealed that these tick-borne phleboviruses were grouped into 8 distinct clusters including most likely novel genetic lineages. Bat mumpsvirus in the family Paramyxoviridae was also isolated from an Epomophorus sp. bat.

研究分野：ウイルス学

キーワード：人獣共通感染症 ウイルス 出血熱 マダニ コウモリ ザンビア アフリカ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

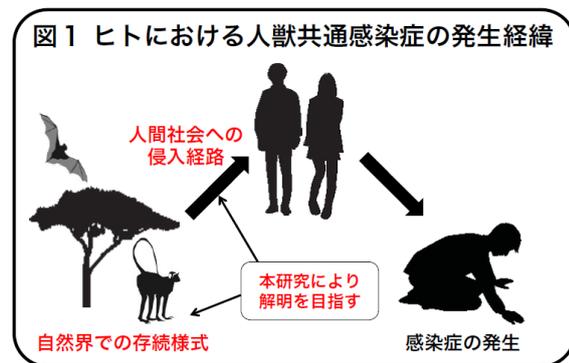
1. 研究開始当初の背景

エボラウイルス病や重症熱性血小板減少症候群（SFTS）を始めとするウイルス性出血熱は世界的な公衆衛生上の脅威である。その一方で、ウイルス性出血熱の多くが新興かつ顧みられない感染症であり、効果的な予防・治療法が確立されていないケースが多い。したがって、これらの感染症の被害を最小限に抑える最も効果的な対策の一つが、自然界から人間社会へのウイルスの侵入を監視し、それを未然に防ぐ“先回り戦略”である。そのためには、ウイルスの自然界における存続様式や人間社会への伝播経路などを理解する必要があるが、ウイルス性出血熱のほとんどが人獣共通感染症でありウイルスの生態は多くの謎に包まれている。

ザンビアはアフリカの内陸国であり、コンゴ民主共和国やアンゴラなどのフィロウイルス（エボラおよびマールブルグウイルス（MARV））感染症発生国とも国境を接している。2008年には新規アレナウイルス（Lujo virus）による出血熱が発生しており、ウイルス性出血熱の疫学上重要な地域と言える。その一方で、同国で発生している出血熱様患者の多くがその原因すら特定されておらず、既知・未知のウイルスが一部の熱性疾患の原因になっている可能性が考えられる。しかしながら、同国におけるフィロウイルスやダニ媒介性ブニヤウイルス（SFTSウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス（CCHFV等）に関する疫学・生態学的知見は非常に限られている。

2. 研究の目的

本研究は原因不明の熱性疾患がザンビアで頻繁に発生していることに着目し、公衆衛生上の脅威となりうる既知および未知のウイルスの探索とその生態（遺伝学的特徴、地理的分布、生活環等）に関する知見を得ることを目的とした。ザンビアにおける疫学研究を通して病原ウイルスの自然界における存続様式を明らかにすると共に、人間社会への侵入経路を特定し人獣共通感染症の発生に対する“先回り戦略”に資する知見の獲得を目指した（図1）。



3. 研究の方法

(1) 哺乳動物（コウモリ等）および節足動物（マダニ等）から既知・未知のウイルスを検出し、ウイルスの遺伝学的・生物学的性状を明らかにする。

研究期間中にザンビア全土より2,327匹のマダニを採取した。マダニ乳剤からRNAを抽出し、汎ダニ媒介性フレボウイルス（TBPV）検出プライマーおよびCCHFV検出プライマーを用いたRT-PCR法によるウイルス遺伝子のスクリーニングを実施した。飽血マダニが産卵した卵およびそれから孵化した幼ダニに対してもTBPV遺伝子のスクリーニングを実施した。また、研究期間において919頭のコウモリ（8種以上）を捕獲し、主要臓器および血清検体を採取した。臓器検体からRNAを抽出し、汎フィロウイルス検出プライマーを用いたRT-PCR法によるウイルス遺伝子のスクリーニングを実施した。PCR産物はサンガー法により塩基配列を決定し、BLAST検索によりウイルス遺伝子の検出を確認した。

コウモリおよびマダニ乳剤は培養細胞（Vero E6細胞等）に接種し、ウイルス分離を試みた。2度の盲検継代を実施し、細胞変性効果を示す検体については次世代シーケンサーを用いてウイルス遺伝子の検出およびウイルス種の同定を試みた。遺伝子スクリーニングもしくはウイルス分離により検出されたウイルスをゲノムの塩基配列に基づき分子系統学的に解析した。

(2) 血清疫学調査を通じてウイルスの哺乳動物への感染性および分布状況を把握する。

研究期間中にウシおよびヒトを対象に、CCHFV特異抗体に対する血清学的スクリーニングを実施した。スクリーニングにはCCHFV核タンパク質（NP）発現細胞を抗原とする蛍光抗体法を用いた。また、コウモリから採取した血清を用いて、フィロウイルス特異抗体の検出を試みた。スクリーニングにはフィロウイルスの表面糖タンパク質（GP）を抗原として用いる、ELISA法を使用した。ウシ、コウモリおよびヒトのウイルスに対する特異抗体保有率と採材地域、採材時期および年齢などを比較解析し、研究の方法①で得られた知見と総合し、ウイルスの分布、季節性、伝播様式などの生態について考察した。

4. 研究成果

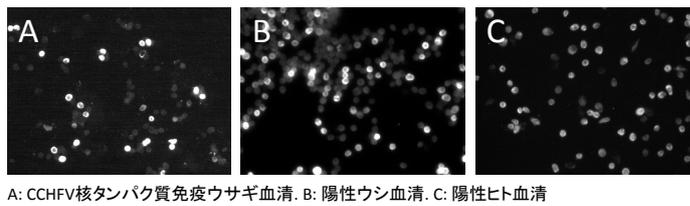
(1) クリミア・コンゴ出血熱ウイルス（CCHFV）に関する研究

これまでザンビアにおいてクリミア・コンゴ出血熱の発生報告はなく、ザンビアにおけるCCHFVの存在を示唆する疫学情報も皆無であった。CCHFVの分布を調査する目的で、ウシおよびヒトを対象にしたCCHFVに対する血清学的スクリーニングを実施した。1,047頭のウシを検査した結果、88頭（8.4%）のウシがCCHFV特異的IgGを保有することがわかった（図2）。CCHFV特異抗体陽性のウシはザンビア国内の広範囲に分布しており、マダニからウシへのウイルス伝播が国内で頻繁に発生していることが示唆された。また、747検体のヒト血清を同様

にスクリーニングした結果、12 検体 (1.6%) から CCHFV 特異的 IgG が検出された (図 2)。この結果は、感染の拡大こそなかったものの、ザンビアにおいて CCHFV のヒトへの伝播が散発的あるいは非症候性に発生していることを示唆している。

イボマダニは CCHFV の主要なベクターとして知られている。期間中に捕獲した 290 匹のイボマダニを対象に RT-PCR 法により CCHFV 遺伝子のスクリーニングを実施した。スクリーニングの結果、290 検体中 11 検体が CCHFV 陽性となった。S および M 遺伝子分節の塩基配列に基づく分子系統解析を実施したところ、ザンビアで検出されたウイルスは Africa 3 クレードに属することがわかった。本研究により、CCHFV がザンビアに存在するということが初めて実証された。

図2 蛍光抗体法陽性血清によるCCHFV核タンパク質発現細胞の蛍光の様子



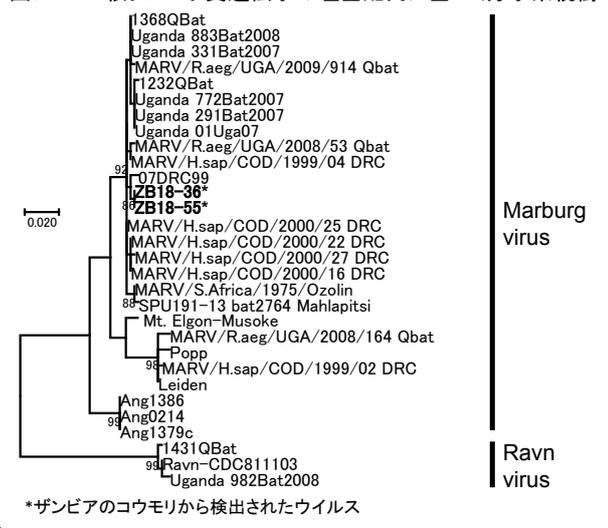
A: CCHFV核タンパク質免疫ウサギ血清. B: 陽性ウシ血清. C: 陽性ヒト血清

(2) フィロウイルスに関する研究

919 頭のコウモリを対象にフィロウイルス GP を抗原に用いる ELISA 法により血清学的にスクリーニングしたところ、エジプトルーセットオオコウモリにおいて MARV 特異抗体の保有率が極めて高いことがわかった (43.8%)。同コウモリ種における MARV 特異抗体保有率をコウモリ捕獲月別に解析したところ、毎年 11~12 月に抗体保有率のピークが訪れることがわかった。2014~2018 年の間に捕獲したエジプトルーセットオオコウモリ 361 頭を遺伝学的にスクリーニングしたところ、2018 年 9 月に捕獲した 2 頭のコウモリからのみ MARV 遺伝子が検出された。11~12 月に抗体保有率のピークが繰り返し訪れることから、毎年 9 月周辺にコウモリ群内で MARV が活発に伝播していることが窺われた。

コウモリから検出された MARV を分子系統学的に解析した結果 (図 3)、ザンビアの MARV はコンゴ民主共和国でマールブルグ熱を引き起こしたウイルスおよびウガンダのエジプトルーセットオオコウモリから検出されたウイルスと非常に近縁であることがわかった。本研究によりザンビアにもフィロウイルスが分布することが明らかとなった。MARV はヒトに対して非常に重篤な出血熱を引き起こす。同コウモリにおけるウイルスのモニタリングを継続し、同国におけるマールブルグ熱の発生リスクについてより詳細な解析をする必要がある。

図3 MARV核タンパク質遺伝子の塩基配列に基づく分子系統樹



*ザンビアのコウモリから検出されたウイルス

(3) 新規ウイルスの検出について

採集した 2,327 匹のマダニを対象に TBPV 遺伝子のスクリーニングを実施した結果、13%のマダニから TBPV 遺伝子が検出された。検出されたウイルス遺伝子の塩基配列に基づく分子系統解析を実施したところ、ザンビアのマダニから検出された TBPV は少なくとも 8 つの系統に分かれることがわかった。過去にヒトに熱性疾患を起こしたことのある Bhanja ウイルス群に属するウイルスも検出され、一部のウイルスに関してはヒトに対して病原性を有する可能性が示唆された。虫卵、幼ダニおよび草地で採集した未吸血の成ダニからも TBPV の遺伝子が検出されたことから、介卵感染および成育ステージを超えた伝播がマダニの間で TBPV が維持されるメカニズムの一つであると思われる。また、脊椎動物への感染がウイルスの自然界における存続に関与しているかは現時点では不明である。

コウモリが遺伝的に非常に多様なパラミクソウイルスを維持していることはよく知られている。ザンビアで捕獲したケンショウコウモリの臓器乳剤から、ヒトの流行性耳下腺炎の病原体であるムンプスウイルスに非常に近縁なウイルス (バットムンプスウイルス) が分離された。本ウイルスはこれまで遺伝子のみを検出報告にとどまっていたが、本研究で初めて感染性ウイルスが分離された。コウモリにおける存続様式、コウモリ以外の動物に対する病原性の解明など、今後の研究的発展が期待される。

5. 主な発表論文等

†: 共同筆頭著者

〔雑誌論文〕 (計 20 件)

1. Matsuno K†, Kajihara M†, Nakao R, 他 13 名. The unique phylogenetic position of a novel tick-borne phlebovirus ensures an ixodid origin of the genus Phlebovirus. **mSphere** [査読有], 3(3): e00239-18, 2018. doi: 10.1128/mSphere.00239-18.
2. Changula K†, Kajihara M†, Mori-Kajihara A, 他 23 名. Seroprevalence of filovirus infection of *Rousettus aegyptiacus* bats in Zambia. **J Infect Dis** [査読有] 218(suppl 5):S312-S317, 2018. doi: 10.1093/infdis/jiy266.
3. Saasa N†, Kajihara M†, Dautu G, 他 8 名. Expression of a recombinant nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus in Vero cells as an immunofluorescence antigen and its use for sero-surveillance in traditional cattle herds in Zambia. **Vector Borne Zoonotic Dis** [査読有] 18(5):273-277, 2018. doi: 10.1089/vbz.2017.2186.
4. Ogawa H, Kajihara M, Nao N, 他 13 名. Characterization of a novel bat Adenovirus isolated from straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*). **Viruses** [査読有] 9(12):E371, 2017. doi: 10.3390/v9120371.

[学会発表] (計 18 件)

†: 代表発表者

1. Kajihara M†, Changula K, Mori-Kajihara A, Eto Y, Miyamoto H, Yoshida R, Shigeno A, Hang'ombe B M, Qiu Y, Mwizabi D, Squarre D, Ogawa H, Harima H, Simulundu E, Kondoh T, Sato M, Takadate Y, Mukonka V, Mweene A S, Takada A. Seroprevalence of filovirus infection of *Rousettus aegyptiacus* bats in Zambia. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 2018.
2. Kajihara M†, Simuunza M, Mori-Kajihara A, Saasa N, Qiu Y, Eto Y, Nakao R, Dautu G, Hang'ombe B, Orba Y, Sawa H, Fukushi S, Morikawa S, Saijo M, Arikawa J, Mweene A, Monze M, Mukonka V, Takada A, Yoshimatsu K. Serological and molecular evidence for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus circulation in ticks, cattle, and humans in Zambia. 2018 Negative Strand RNA Virus Meeting. 2018.
3. Mweene A†, Kajihara M†, Inano K†, Takada A. Surveillance of Viral Zoonoses in Africa. Prince Mahidol Award Conference 2018. 2018.
4. Kajihara M†, Simuunza M, Nakao R, Mori A, Qiu Y, Eto Y, Matsuno K, Furumoto H, Kapila P, Dautu G, Mweene A, Takada A. Discovery of genetically diverse phleboviruses in ticks in Zambia. 9th Tick and Tick Borne Pathogen Conference and 1st Asia Pacific Rickettsia Conference. 2017.
5. Takada A, Kajihara M†, Mori A, Yoshida R, Miyamoto H, Igarashi M, Sawa H, Orba Y, Nakamura I, Isoda N, Ishii A, Ito K, Arikawa J, Yoshimatsu K, Ogawa H, Simulundu E, Changula K, Saasa N, Muleya W, Yabe J, Munyeme M, Hang'ombe B, Simuunza M, Choongo K, Mweene A. Surveillance of Viral Zoonoses in Africa. The 2nd International Joint Symposium: Promotion of Infectious Disease Research Cooperation between Africa and Japan toward Science, Technology and Innovation. 2017.
6. Changula K†, Kajihara M†, Miyamoto H, Hang'ombe B, Mori A, Qiu Y, Eto Y, Simulundu E, Ndebe J, Shigeno A, Ogawa H, Moonga L, Kapila P, Mweene A, Takada A. Filovirus surveillance in *Rousettus aegyptiacus* bats in Zambia. 9th International Symposium on Filoviruses. 2017.
7. Kajihara M†, Ogawa H, Miyamoto H, Changula K, Qiu Y, Mori A, Yoshida R, Thomas Y, Nakagawa E, Hang'ombe B, Simulundu E, Muleya W, Katampi J, Igarashi M, Moonga L, Ndebe J, Kapila P, Mweene A, Takada A. Seroepidemiological Prevalence of Multiple Species of Filoviruses in Fruit Bats (*Eidolon helvum* and *Rousettus aegyptiacus*) in Zambia. 8th International Symposium on Filoviruses. 2016.

[図書] (計 3 件)

1. 梶原将大, 高田礼人. 日本臨床ウイルス学会. 臨床とウイルス 45/1 2017年3月号, 32-40, 2017.
2. 梶原将大, 高田礼人. 医学書院. 生体の科学 第66巻第4号, 296-300, 2015.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。